



Original Article/Artigo Original

## Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobianas de extratos etanólicos de *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* e *Plantago major* sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*

Fabiola Batista de Souza<sup>1</sup>, Márcia Michele Frederico de Souza<sup>1</sup>, Paulo Vitor Duarte Damasceno<sup>1</sup>, Maria Celeste Gomes de Barros<sup>1</sup>, Cleniuda Oliveira Lima Loliola<sup>1</sup>, Andrea de Souza Monteiro<sup>2</sup>, Gabriella Freitas Ferreira Corrêa<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Ceuma, São Luís do Maranhão, MA, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares, Governador Valadares, MG, Brasil.

\*Autor Correspondente: Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares, Av. Dr. Raimundo Monteiro de Rezende, 330, Centro, 35010-177, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. Tel./fax: + 55 33 2102 8000.

✉ [gabriella.farmacia@yahoo.com.br](mailto:gabriella.farmacia@yahoo.com.br)

Received: 27 June 2014; Revised 12 July 2014; Accepted 20 July 2014; Published online: 8 August 2014

### RESUMO

A formação do biofilme dental, fator etiológico primário da cárie dentária e da doença periodontal, ocorre a partir de processos que envolvem mecanismos de aderência dos micro-organismos à película adquirida, proporcionando a instalação de uma comunidade microbiana diversificada, dinâmica, cooperativa, de elevado potencial patogênico e, muitas vezes, resistentes a agentes microbianos. Foi propósito deste estudo avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana dos extratos de *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* e *Plantago major* frente às bactérias cariogênicas, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*, através da determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). A escolha destas plantas se baseou no fato das mesmas serem utilizadas na medicina popular como fonte de recurso terapêutico no tratamento de diversas infecções causadas por micro-organismos. Diante dos resultados alcançados pode-se afirmar que o extrato da *Bauhinia forficata* apresentou potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as linhagens de *S. mutans* e *S. sanguis*, indicando a importante significância clínica de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para o controle da formação do biofilme dental.

**Palavras-chave:** *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata*, *Plantago major*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*

**ABSTRACT:** (*In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of ethanol extracts of *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* and *Plantago major* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*)

The formation of biofilm, the primary etiological factor of dental caries and periodontal disease, occurs from processes involving mechanisms of adhesion of microorganisms acquired the film, providing the installation of a diverse microbial community, dynamic, cooperative, high pathogenic potential and often resistant to antimicrobial agents. Purpose of this study was to evaluate *in vitro* antibacterial activity of extracts of *Arnica montana* L., *Plantago major* and *Bauhinia forficata* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* by determination of minimal bactericidal concentration (MBC). The choice of plants was based on the fact that they are used in folk medicine as a source of therapeutic use to treat various infections caused by microorganisms. Considering the results can be stated that the extract of *Bauhinia forficata* showed a potential of antimicrobial activity *in vitro* against strains of *S. mutans* and *S. sanguis*, indicating the important clinical significance of evaluating alternative and economically feasible to control the formation of biofilm.

**Keywords:** *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata*, *Plantago major*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*

### INTRODUÇÃO

Dentre as aplicações terapêuticas das plantas medicinais, uma das mais estudadas é seu potencial como fonte de compostos com atividade antimicrobiana. Um dos indícios desse potencial é a escassez de doenças infecciosas em plantas

silvestres. Em situações de adaptação biótica, as plantas produzem uma enorme variedade de pequenas moléculas antibióticas, geralmente classificadas como fitoalexinas. Sua natureza estrutural é diversa, compreendendo terpenóides, glicosídeos, flavonóides e polifenóis. Dessa forma, torna-se claro que as plantas adotaram um paradigma

diferente - sinergismo - para combater as infecções (HEMAISWARYA *et al.*, 2008). Esse efeito sinérgico explica a superioridade terapêutica de muitos extratos de plantas derivados da medicina tradicional quando comparados com seus respectivos constituintes isolados (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009).

Em ampla revisão sobre plantas medicinais, RECIO e RIOS (1989), fizeram uma avaliação sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de vegetais. Quanto ao potencial antibiótico, destacaram-se os resultados obtidos com óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, triterpenos, citral, mirceno, timol, xantanol, ácido caurêmico, entre outros que, em baixas concentrações, exerceram inibição sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos, confirmando a grande importância que possuem como perspectivas para a produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser usados na terapêutica de processos infecciosos.

A *Arnica montana* L. é uma planta herbácea perene, de aproximadamente 70 cm de altura, da família das Asteraceae e originária das regiões montanhosas da Sibéria e da Europa Central. Atualmente, sua ocorrência espontânea é muito rara, sendo cultivada em diversos países, visando sua utilização terapêutica (MARTINS *et al.*, 1994). Existem muitas plantas chamadas popularmente de Arnica, entretanto, na verdade, existem espécies diferentes que não possuem a mesma aplicação terapêutica. A variedade dos produtos a base de Arnica existentes no mercado explica a diversa empregabilidade desta planta, como sabonetes para limpeza de partes contundidas, conservando a pele macia e elástica, fazendo desaparecer as rachaduras e asperezas; pasta dental e água dentifrícia; óleo tônico capilar; óleo e pomada para fricção muscular, etc. (MARQUES, 2006).

Desde a Idade Média, os efeitos antiinflamatórios da Arnica são conhecidos, bem como sua aplicação na cicatrização de ferimentos graças às suas propriedades regeneradoras de tecidos (ROCHA, 2006). Sua utilização é indicada para novos fins terapêuticos como ação analgésica (BEVILAQUA,

2003), antiedematosa (SARTORATTO *et al.*, 2004) e antimicrobiana (AMATO *et al.*, 2007).

A espécie *B. forficata* L., espécie nativa da América do Sul, também conhecida como Pata de vaca ou unha de boi, apresenta suas folhas fendidas no meio, formando dois lobos ou folíolos, que a assemelham a uma Pata de bovino, como o nome popular sugere. No ramo onde fica aderido o pecíolo de cada folha existem dois espinhos, formando uma espécie de forca, daí o nome *Bauhinia forficata* L. Estudos de natureza fitoquímica indicam a presença de glicosídeos, ácidos orgânicos, sais minerais, taninos, pigmentos e mucilagens nesta espécie (LORENZI e MATOS, 2002). As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, especialmente *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*, são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente infecções e processos dolorosos (VAZ e TOZZI, 2005).

A espécie *Plantago major* L. é uma planta herbácea conhecida popularmente como Tansagem, tanchagem e plantagem, pertencente à família das Plantaginaceae, que ocorrem espontaneamente nas regiões de clima temperado ou subtropical, sendo facilmente cultivada no Brasil (FREITAS *et al.*, 2002). Apresenta-se pequena, bienal ou perene, ereta, acaule, podendo atingir cerca de 20 a 30 cm de altura. Apresenta folhas dispersas em roseta basal, com pecíolo longo, as flores são muito pequenas, dispostas em inflorescências espiçadas (LORENZI e MATOS, 2002). Segundo SAMUELSEN (2000), estão presentes na *P. major* L. compostos biologicamente ativos, como polissacarídeos, lipídios, derivados do ácido cafeico, flavonóides, glicosídeos iridóides e terpenóides. Alcalóides e ácidos orgânicos também têm sido verificados. As atividades terapêuticas de extratos de *P. major* têm sido comprovadas, incluindo as antiinflamatórias, analgésicas, antioxidantes, antimicrobianas, imunomoduladoras e anti-ulcerogênicas. Apresenta propriedades diuréticas, anti-diarréicas, expectorantes, hemostáticas e cicatrizantes, sendo empregada contra infecções das vias respiratórias, bronquite crônica e como auxiliar no

tratamento de úlceras pépticas (LORENZI e MATOS, 2002).

Estudos descrevem o uso do chá das folhas de *P. major* L. principalmente na forma de gargarejo, no combate às inflamações da boca, garganta e gengivas sangrentas, além de citarem a ação laxativa (mucilagem), depurativa, contra acne, cravos e espinhas, e também a ação contra picadas de insetos desta espécie vegetal (FREITAS *et al.*, 2002). SANTOS *et al.* (1988) justificaram a ação adstringente, cicatrizante, antimicrobiana e anti-inflamatória desta espécie devido a presença do componente fitoquímico tanino e mucilagens.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui um ou mais substâncias que podem se utilizadas para fins terapêuticos”. A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JR., 2005). Diante desse contexto, muitos estudos estão sendo realizados, identificando e isolando princípios ativos presentes em extratos naturais, para que estes novos compostos quimicamente caracterizados, se efetivos, possam ser sintetizados e utilizados no controle de enfermidades. Dentre estes estudos, destacam-se atualmente a investigação de produtos naturais como agentes promissores para prevenir doenças orais, especialmente relacionadas ao biofilme dental, como a cárie dental e a doença periodontal, grandes problemas de saúde pública (YATSUDA *et al.*, 2005).

A placa bacteriana é o fator etiológico primário das duas doenças mais prevalentes que acometem a humanidade – cárie dentária e doença periodontal (SILVA, 2010). São necessárias apenas algumas horas, após o nascimento, para que a boca do recém-nascido fique colonizada por inúmeros micro-organismos. No primeiro dia já é possível detectar lactobacilos, *Streptococcus salivarius*, *Veillonella alcalescens* e *Candida albicans*. Com o crescimento, a microbiota bucal altera-se e só após a erupção dentária iniciam a colonização por *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans*. O desenvolvimento da microbiota normal bucal é

influenciado por fatores nutricionais quer pela especificidade imunológica de cada indivíduo (PEREIRA *et al.*, 2010).

*Streptococcus mutans* são cocos Gram-positivos, dispostos isoladamente ou em cadeia, anaeróbios facultativos com metabolismo fermentativo e microaerófilos. Fermentam diversos açúcares, como manitol e sorbitol, diferenciando-se assim dos demais estreptococos da cavidade oral (LORENZO, 2004). *S. mutans* tem sido considerado a principal espécie bacteriana envolvida na formação da placa bacteriana por possuírem a capacidade de colonizar os dentes, produzirem polissacarídeos intra e extracelulares, serem altamente acidogênicos (são capazes de viver e se multiplicarem no meio ácido que originaram) e acidúricos e metabolizarem várias glicoproteínas salivares, sendo responsáveis principalmente pela fase inicial da lesão (MALTZ, 1997). O único habitat natural conhecido de *S. mutans* é a superfície dentária. O aumento destes micro-organismos está relacionado com alto consumo de açúcar combinado com a diminuição do pH da cavidade oral. A adesão deste micro-organismo está relacionada à atividade da enzima glicosiltransferase (GTF), que sintetiza glucanos extracelulares insolúveis a partir da sacarose. Os glucanos produzidos por essas bactérias facilitam a aderência e o acúmulo de micro-organismos, estabelecendo uma matriz extracelular resistente às forças mecânicas normais de remoção presentes no hospedeiro, e proporcionando alguma proteção contra o sistema imune e defesas não imunes (CANETTIERI *et al.*, 2006).

Muitas espécies que participam da constituição da placa dental estão associadas ao bom estado de saúde do hospedeiro, como o *S. sanguis*, que apresenta baixo potencial cariogênico, mas é a primeira bactéria a aderir seletivamente e colonizar a superfície dental. *S. sanguis* é o estreptococo não *mutans* predominante na microbiota do biofilme bucal e apresenta forte associação aos componentes da saliva (KAWASHIMA *et al.*, 2003). As placas dentais constituídas basicamente por colonizadores pioneiros são consideradas benéficas ao hospedeiro, pois reduzem o risco de infecções agindo como uma

barreira contra a colonização por agentes exógenos, frequentemente patogênicos. Com a maturação do biofilme dental os níveis de *S. sanguis* aumentam, decrescendo após a colonização do biofilme por *S. mutans*, isto ocorre devido as condições ambientais, já que no pH ácido ocorre a inibição do crescimento de *S. sanguis* favorecendo a espécie do grupo *mutans*, modulando assim a competição e a coexistência entre as espécies (LINHE *et al.*, 2010).

A utilização de produtos fitoterápicos mostra-se uma alternativa interessante, contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças bucais. Baseado no conhecimento de que as plantas medicinais produzem uma grande variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas, são de grande relevância o estudo e a descoberta de plantas que exerçam esse tipo de atividade farmacológica direcionada para a prevenção de doenças bucais, talvez com menores efeitos adversos quando comparados aos produtos industrializados já existentes e com ação mais seletiva. É muito importante para obtenção de um controle efetivo da formação de um biofilme patogênico. As plantas utilizadas foram escolhidas devido ao fato de serem muito utilizadas na medicina popular como fonte de recurso terapêutico no tratamento de diversas infecções causadas por micro-organismos. Vários estudos têm demonstrado a presença de substâncias com atividade antimicrobiana em uma grande quantidade de extratos de diferentes espécies vegetais (MARQUES, 2006; SILVA *et al.*, 2006; YATSUDA *et al.*, 2005). Portanto, o presente trabalho visa analisar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana dos extratos da *Arnica montana* L. (*Arnica*), *Bauhinia forficata* (Pata de vaca) e *Plantago major* (Tansagem) frente as duas espécies de bactérias presentes na cavidade bucal *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas utilizadas foram a *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* e a *Plantago major*, que foram adquiridas no comércio local no estado seco. A preparação dos extratos foi de acordo com a metodologia adaptada de SIMÕES *et al.* (2004), utilizando-se a turbólise para obtenção dos extratos etanólicos brutos. Foi adicionado 15 g do material vegetal triturado em um copo de liquidificador (1000 ml) juntamente com 150 mL de solvente etanol. O aparelho de liquidificador foi submetido a realizar rotações durante cinco minutos, repetindo o processo por seis vezes. Para cada planta realizou-se esse mesmo processo.

A solução obtida de cada planta foi filtrada em papel filtro, colocada em um balão de fundo redondo e, levada ao rota-vapor com pressão reduzida, à temperatura de 40 °C e 120 rpm. Em seguida, a solução de cada balão foi transferida para um béquer, que foi conduzido a uma estufa de fluxo de ar a 40 °C, onde permaneceu até a completa secagem do extrato. Após a secagem, cada béquer contendo extrato foi armazenado na geladeira até a requisição dos bioensaios de susceptibilidade.

A análise de alguns metabólitos secundários foi realizada segundo a metodologia adaptada de MATOS (1997). Em cada erlenmeyer foram adicionados 5 g das plantas (*A. montana* L.; *B. forficata*; *P. major*). Foram adicionados 100 mL de etanol e 30 mL de água destilada, que ficaram sob agitação magnética e aquecimento brando por cinco minutos. Após o resfriamento a mistura foi filtrada.

Para cada extrato foram realizadas provas para verificar a presença de açúcares redutores (teste de Fehling), de taninos (teste com gelatina salgada e com acetato de chumbo 10%), de flavonoides gerais (teste com ácido clorídrico), de antraquinonas (teste com ácido sulfúrico e aquecimento), de heterosídeos cardiotônicos (teste de Baljet), de saponinas (teste de formação de espuma), de núcleos triterpenos e esteroides (reação de Liebermann-Burchard) e de alcalóides (testes com os reagentes de Mayer, Drangendorff e Hager).

### Testes Microbiológicos

A atividade antimicrobiana dos extratos das plantas foi avaliada através da determinação de concentrações bactericidas mínimas (CBM) utilizando do ensaio de macrodiluição em caldo, de acordo com o protocolo da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2003) com algumas adaptações. Para a realização dos ensaios *in vitro*, foram utilizadas duas espécies de *Streptococcus*: *S. sanguis* (ATCC 10557) e *S. mutans* (ATCC 9927). As amostras encontravam-se congeladas em caldo infuso de cérebro-coração (BHI) contendo 10% de glicerina, em freezer a -80 °C no Laboratório de Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce. Neste estudo foi utilizado o meio de cultura Müller-Hinton (Imedia) para determinação da CBM dos extratos. Inicialmente procedeu-se com o descongelamento da cultura-estoque e em seguida as bactérias (*S. mutans* e *S. sanguis*) foram repicadas para tubos de ensaio contendo caldo infuso cérebro coração (BHI) e incubadas a 37 °C por aproximadamente 12 horas.

Os extratos provocaram grande turvação dos meios de cultura, o que dificultaram a visualização do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a determinação da CIM. Assim, optou-se pela determinação da CBM. Para procedimento CBM, a cultura de bactérias foi ajustada de acordo com o padrão da Escala de McFarland n° 0.5. Os extratos utilizados nos ensaios foram dissolvidos em solvente orgânico DMSO (dimetilsulfóxido) até atingirem a concentração final de 250 mg/mL, para obtenção das

soluções estoques. Após este procedimento foram obtidas as seguintes concentrações de extrato: 10mg/mL, 5mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL. Em seguida foi inoculado de 50 µL das suspensões de cada bactéria nos tubos contendo os extratos nas diferentes concentrações. Controles positivos e negativos foram realizados tanto para *S. sanguis* como para *S. mutans*. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Todos os tubos do teste foram incubados a 37 °C por 24 horas em microaerofilia. Os testes foram realizados em triplicata. Em cada, Pipetou-se 50 µL das soluções de cada tubo dos respectivos testes em placas de Petri contendo o meio Ágar Müller-Hinton e então foram incubadas a 37°C em estufa por um período de 24 horas em microaerofilia.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes realizados constaram da identificação de prováveis grupos de metabólitos secundários presentes nas plantas e os resultados obtidos na análise estão apresentados na Tabela 1.

Os metabólitos secundários possuem diferentes solubilidades, de acordo com a sua estrutura química. O solvente utilizado no presente trabalho foi o etanol, o qual proporcionou a extração de compostos polares. De acordo com os resultados apresentados na tabela 2, todos os extratos apresentaram taninos na sua composição química, conforme outros estudos já realizados (LORENZI e MATOS, 2002; MARQUES, 2006; SANTOS *et al.*, 1988; SARTORATTO *et al.*, 2004).

SUBSTÂNCIAS	ESPÉCIES VEGETAIS *		
	<i>Arnica montana L.</i>	<i>Bauhinia forficata</i>	<i>Plantago major</i>
Acúcar redutor	-	-	-
Taninos	+	+	+
Flavonóides	+	+	-
Antraquinonas	-	-	-
Heterosídeos Cardiotônicos	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Triterpenos e esteróides	-	-	-
Alcalóides	-	-	-

**Tabela 1** – Resultados obtidos nos testes de caracterização de alguns metabólitos secundários dos extratos vegetais das plantas em estudo. Sinal positivo (+) significa resultado positivo para caracterização da substância; Sinal negativo (-) Resultado negativo para caracterização da substância. \* Testes realizados em duplicata;

Os flavonóides constituem uma classe de polifenóis de considerável importância devido a sua relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. A reação de cianidina utilizada para sua detecção baseia-se no fato dos derivados flavônicos de cor amarela serem reduzidos adquirindo uma coloração avermelhada. Esse ensaio é negativo para chalcona e isoflavonas. De acordo com a tabela 2 a formação de um precipitado não indicou a presença de compostos flavônicos no extrato da *Plantago major* diferente do que FREITAS et al. (2002) apresentara em seus estudos. Já a formação de um precipitado de coloração laranja indicou a presença de compostos flavônicos, que de acordo com a tabela 1, provavelmente indicam a presença de flavonas nos extratos da *Arnica montana L.* e da *Bauhinia forficata*, conforme também já descreveram diversos estudos realizados com a *A. montana L.* e *B. forficata* (LORENZI e MATOS, 2002; MARQUES, 2006; ROCHA, 2006; SILVA et al., 2006).

O teste de Baljet não detectou a presença de heterosídeos cardiotônicos nas espécies testadas. Ainda de acordo com a tabela 2, nenhum dos extratos apresentou resultado positivo para a presença de triterpenos e esteróides, nem para saponinas,

antraquinonas, alcalóides e açúcares redutores. SILVA e CECHINEL FILHO (2002) reportaram em seus estudos sobre a composição química das plantas do gênero *Bauhinia*, a presença na espécie *B. forficata* de esteróides e lactonas, além dos flavonóides já citados.

Observa-se que os extratos de Arnica e Tansagem não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *S. sanguis* e *S. mutans*, nas concentrações testadas (Tabelas 2 e 3). AMATO et al. (2007) demonstraram em seus estudos com cepas-padrões de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, que a Arnica, embora seja largamente usada como fitoterápico e também na medicina popular para tratamentos de distúrbios inflamatórios, cicatrização de feridas, absorção de edemas, ferimentos, antiparasitário (*Plasmodium falciparum* e *Tipanossoma cruzi*), nas condições experimentais, não apresentou ação antimicrobiana perante as cepas citadas. Entretanto, NARDY et al. (2000) em experimentos sobre a ação da Arnica em patógenos orais, verificaram a ação antimicrobiana apenas discreta contra algumas espécies de *Streptococcus*.

Concentrações do extrato (mg/mL)	MICRO-ORGANISMOS *	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
10	+	+
5	+	+
2.5	+	+
1.25	+	+
0.625	+	+

**Tabela 2** - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico bruto de *Arnica montana* L. (Arnica). Sinal positivo (+) significa crescimento microbiano; Sinal negativo (-) significa ausência de crescimento microbiano. \*Testes realizados em triplicata.

Concentrações do extrato (mg/mL)	MICRO-ORGANISMOS *	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
10	+	+
5	+	+
2.5	+	+
1.25	+	+
0.625	+	+

**Tabela 3** - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico bruto de *Plantago major* (Tansagem). Sinal positivo (+) significa crescimento microbiano; Sinal negativo (-) significa ausência de crescimento microbiano. \*Testes realizados em triplicata.

Concentrações do extrato (mg/mL)	MICRO-ORGANISMOS *	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
10	-	-
5	-	-
2.5	-	-
1.25	+	-
0.625	+	+

**Tabela 4** - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico bruto de *Bauhinia forficata*. Sinal positivo (+) significa crescimento microbiano; Sinal negativo (-) significa ausência de crescimento microbiano. \*Testes realizados em triplicata.

Apesar do extrato de Tansagem não ter apresentado atividade antimicrobiana frente aos patógenos estudados, é uma espécie com importância na terapêutica e vem sendo submetida a ensaios de atividade farmacológica, inclusive de atividade sobre o crescimento de outras bactérias (FARIAS *et al.*, 2002) envolvidas na formação do biofilme dental (BUFFON *et*

*al.*, 2001). Em estudo realizado na região sul de Cuiabá, percebeu-se a grande utilização do chá das folhas da *Plantago major*, como gargarejos. Esta espécie possui indicações para amigdalite, estomatite, faringite, e de uso externo para úlceras e feridas, sob a forma de emplastro podendo agir como cicatrizante (AMATO *et al.*, 2007).

O extrato etanólico da Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*) apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *S. mutans* e *S. sanguis*, resultado relevante para a Odontologia, podendo contribuir para a prevenção e tratamento de patologias causadas por esses micro-organismos presentes na cavidade bucal. Constatou-se que o extrato da *B. forficata* é bactericida para *S. mutans* a partir da concentração 2,5mg/mL. Já para *S. sanguis* o extrato foi bactericida a partir da concentração 1,25mg/mL. A Pata de vaca vem sendo muito utilizada na medicina popular como hipoglicemiante (BARBOSA FILHO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; AGRA *et al.*, 2007; MENEZES *et al.*, 2007), despertando grande interesse por parte dos pesquisadores em sua propriedades fitoterápicas. Assim, a atividade antimicrobiana da Pata de vaca pode ser atribuída aos taninos e flavonóides encontrados nessa planta.

Em particular, os taninos possuem três hipóteses quanto ao mecanismo de ação antimicrobiana: a primeira, quando ocorre inibição de enzimas bacterianas, ou complexando-se com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos micro-organismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Segundo LOGUERCIO *et al.* (2005), os taninos possuem considerável atividade contra bactérias Gram-positivas, devido a constituição da parede celular dessas bactérias, menos complexa e com menor teor lipídico, permitindo que os taninos atuem sobre a membrana alterando sua funcionalidade. Outra característica interessante dos taninos é a capacidade de inibição enzimática, como a glicosiltransferase, produzida por *S. mutans* (SIMÕES *et al.*, 2004).

No entanto, tanto a Arnica como a Tansagem mostraram resultados positivos para taninos, mas não apresentaram atividade microbiana frente aos micro-organismos estudados. Isso pode ser atribuído à concentração e ao tipo de taninos que cada planta apresentou durante o experimento. Os flavonóides

respondem pela pigmentação das plantas e, dentre as atividades biológicas mais estudadas nos últimos anos estão sua ação antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, anticancerígena (FERNANDES *et al.*, 2005), e antimicrobiana, cujo mecanismo de ação, provavelmente, se deve à sua habilidade de complexar-se com a parede celular das bactérias e, quanto mais lipofílico for o flavonóide, melhor ocorrerá a ruptura da membrana do microrganismo (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

Diversos estudos possibilitaram a identificação de um marcador químico, denominado kaempferitrina, um flavonóide que está presente somente nas folhas, e que contribui para explicar a atividade hipoglicemiante agregada para esta espécie (SILVA *et al.*, 2006; SILVA e CECHINEL FILHO, 2002). SOUZA *et al.* (2000) também avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos da Pata de vaca e observaram inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Streptococcus aureus* na concentração de 1000 µg/mL.

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (LOPES, 2001). As variações referentes à determinação da CBM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores, gerando dificuldades no que concerne à comparação dos resultados de diversos estudos. Dentre eles pode-se citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas, a quantidade de extrato testada, a apresentação do produto a ser avaliado (tintura, extrato etanólico, óleo essencial, entre outros) bem como critérios metodológicos empregados para a realização dos ensaios.

Diferenças muitas vezes verificadas entre pesquisadores muitas vezes refletem a falta de padronização para os testes microbiológicos, dificultando o cotejamento de resultados (FENNEL *et al.*, 2004). Muito cuidado deve se tomar na



identificação de uma planta, com seus nomes populares, já que na literatura foram encontrados estudos com plantas denominadas “Arnica”, porém com um nome científico diferente da denominação da espécie vegetal abordada neste estudo (FREIRES *et al.*, 2010).

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a *Bauhinia forficata* possa ser uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra patógenos associados ao biofilme dental. No entanto recomenda-se mais estudos para avaliar a segurança e a viabilidade do uso dessa planta para fins medicinais.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. Bras. Farmacognosia, 17:114-140, 2007.

AMATO, A.L.; CARVALHO, A.C.; COUTINHO, S.D.A. Atividade antimicrobiana *in vitro* de *Arnica montana* L. Estudos Biol., n.29 (67):165-170, abr/jun., 2007.

BARBOSA FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. Rev. Bras. Farmacognosia, 15:392-413, 2005.

BEVILAQUA, C. H. Avaliação do uso do medicamento homeopático *Arnica montana* no tratamento da dor e edema pós-operatórios em cirurgia buco-maxilo-facial. 2003. 53p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxio-Faciais) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. BRANDÃO, M. G. *Plantas medicinais e fitoterapia*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

CANETTIERI, A.C.V., KRETCHETOFF, F.Y., FUJARRA, F.C., MOREIRA, D., UNTERKIRCHER, C.S. Efeito do anticorpo monoclonal 56G sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* em caldo e no acúmulo de placa bacteriana *in vitro*. Ciene Odontol Bras, v.9 (4): 67-75, 2006.

FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L.; Mc GAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN, J. Review. Assessing African medicinal plants of efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. J. Ethnopharmacol, 94: 205-217, 2004.

FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. Atividade antimicrobiana das plantas *Planthymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. Rev. Patol. Trop., Goiânia, v.34, n.2, p.113-122, mai-ago, 2005.

FREITAS, A.G.; COSTA, V.; FARIAS, E.T.; LIMA, M.C.A.; SOUSA, I.A.; XIMENES, E.A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. Rev. Bras. Farmacogn., v.12, supl., p.64-65, 2002.

FREIRES, I.A.; ALVES, L.A.; JOVITO, V.C.; ALMEIDA, L.F.D.; CASTRO, R.D.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Shinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. Odontol. Clin. Cient., Recife, 9 (2): 139-143, abr/jun, 2010.

HEMAISWARYA, S; KRUTHIVENTI, A. K; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, v.15, n.8, p. 639-652. 2008.

KAWASHIMA, M.; HANADA, N.; HAMADA, T.; TAGAMI, J.; SENPUKU, H. Real-time interaction of oral *streptococci* with human salivary components. Oral Microbiol Immunol, 18:220-225, 2003.

- LINDHE, Jan; LANG, Niklaus P.; KARRING, Thorkild. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- LOGUERCIO, A.P. et al.. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells). Ciência Rural, Santa Maria, v.35, n.2, mar-abr, 2005.
- LOPES, N.P. A essência da Arnica. Fapesp Pesquisa. v.64, p:42-44, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. de A. Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Microbiota, 2002. 512p.
- LORENZO, J.L. Microbiologia para o estudante de odontologia. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.
- MALTZ, M.; CARVALHO, J. Diagnóstico da doença cárie. In: ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas, 1997.
- MARQUES, M.F. Estudo da Resposta Imunológica induzida por *Arnica montana* L. 2006. 112p, Tese (Doutorado em Análises Clínicas)- Universidade Estadual Paulista/UNESP, Araraquara, São Paulo, 2006.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. Viçosa: Imprensa Universitária, 1994.
- MATOS, F.A. Introdução a Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC Edições, 1997.
- MENEZES, F.S.; MINTO, A.B.M.; RUELA, H.S.; KUSTER, R.M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. Rev. Bras. Farmacogn, v.17, p. 8-13, 2007.
- NARDY, R.; NASCIMENTO, C.M.; JORGE, A.O.C.; ZELANTE, P.M. Análise da ação antimicrobiana das medicações Calendula, Arnica e Echinacea. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 17. Águas de Lindóia, 2000. Anais. P. 746. [Online] 2000. Disponível em URL: <http://www.odontologia.com.br/paineis.asp?id=746>. Acesso em 20 setembro, 2011.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANOLARIS, 2003. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Microbianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio. Norma Aprovada: M7 - A6. vol. 23. n. 2.
- PEREIRA, Andreia G.; NEVES, Ana M.; TRINDADE, Antonio C. Imunologia da cárie dentária. Acta Med Port, 23: 663-668, 2010.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003, 325p.
- RECIO, M.C. e RIOS, J.L. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. Phytotherapy Research, v. 3, p. 117-125, 1989.
- ROCHA, A. Q. Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da Arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC), 2006. 71p. Dissertação (Mestrado em Promoção da saúde)- Universidade de Franca, São Paulo, 2006.
- SAMUELSEN, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. J. Ethnopharmacol., v.71, n.1-2, p.1-21, Jul., 2000.
- SANTOS, C.; TORRES, K.; LEONART, R. Plantas medicinais (herbarium, *microbiota et scientia*). São Paulo: Icone / Scientia et Labor, 1988.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity os essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz. J. Microbiol., 35: 275-280, 2004.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SIMÕES, Claudia M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SILVA, K.L. e CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*: 449-454. 2002

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn*, v.16, p.455-462, 2006.

SILVA, Penildon. *Farmacologia*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SOUZA, R. S. S.; SANTOS, D. R.; BELLA CRUZ, R. C. VI Seminário Integrado de Iniciação Científica. Camboriú, Brasil, 2000.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemicals flavanones against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnofarmacology*, v. 50, p. 27-34, 1996.

VAZ, A.M.S.F. e TOZZI, A.M.G.A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. *Revista Brasil. Botânica*, v.28, n.3, p.477-491, jul/set., 2005.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.M.A. Plantas Medicinais: Cura Segura? *Química Nova*, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

WAGNER, H; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, v. 16, n. 2-3, p. 97-110. 2009.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; MURATA, R.M.; REHDER, V.L.G.; MELO, L.V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 183-289, jan. 2005.